



# VARIACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE *Trifolium repens* L. TRAS FERTILIZACIÓN CONTINUADA EN PRADOS DE SIEGA

VARIATION IN MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF  
*Trifolium repens* L. AFTER CONTINUING FERTILIZATION IN MEADOWS

R. GARCÍA, S. DEL RÍO, C. VALDÉS, L. HERRERO Y S. LÓPEZ

Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-Universidad de León) Finca Marzanas s/n. Grulleros E-24346 León.  
[rgarn@unileon.es](mailto:rgarn@unileon.es)

## RESUMEN

Se describen las características morfológicas de *Trifolium repens* L. en 64 parcelas de un ensayo de fertilización mineral realizado en la Montaña de León durante un periodo de 30 años. Al final de la experiencia, previa separación del trébol blanco en el segundo corte, se analizan 13 características de sus hojas (5), inflorescencias (5), frutos y semillas (3). La superficie foliar (como medida de la superficie del foliolo central de la hoja) es la característica morfológica más importante para la diferenciación de las plantas de trébol mientras que los demás parámetros tienen una importancia menor. Se establece la relación entre la fertilización aportada y la superficie foliar; las dosis de nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K) actúan como factores de variabilidad y se describen 4 tipos de trébol blanco. Los tipos con mayor superficie foliar ( $205 \pm 18 \text{ mm}^2$ ) se obtuvieron con la mezcla de dosis bajas de N ( $20 \text{ kg ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ), moderadas de P ( $80 \text{ kg ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ) y altas de K ( $160 \text{ kg ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ). Los de menor superficie foliar ( $117 \pm 6 \text{ mm}^2$ ) se obtuvieron con la mezcla de dosis bajas de P ( $25 \text{ kg ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ) y bajas/moderadas dosis de N y K ( $79 \text{ kg ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ) en ambos casos.

**Palabras clave:** Superficie foliar, ecuaciones de regresión, variabilidad, trébol blanco.

## SUMMARY

This study examined the morphological characteristics of *Trifolium repens* L. sampled from 64 plots of a mountain meadow located in the North of the province of León (Spain), where a fertilization assay was performed for 30 years. At the end of the experiment, plants of white clover were obtained by manual separation from herbage harvested from each plot in the second cut, and a number of characteristics were determined in leaves (5 parameters), inflorescences (5 parameters), fruits and seeds (3 parameters). The leaf area (measured as the surface of the central leaflet) was the most important morphological characteristic to discriminate the clover plants, whereas other parameters were less important. Multiple linear regression was used to establish the relationships between the doses of fertilizers (N, P, K) applied and the clover yield or the clover leaf area in the plants sampled in each plot. Considering the morphological characteristics studied (mainly the leaf area) plants of white clover were clustered in four groups. Clover plants with a greatest leaf area ( $205 \pm 18 \text{ mm}^2$ ) were obtained from plots with low doses of nitrogen fertilizer ( $20 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ ) and doses of phosphorus and potassium ( $80 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$  and  $160 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ ). Conversely, plants with a smallest leaf area ( $117 \pm 6 \text{ mm}^2$ ) were collected from plots fertilized with low doses of phosphorus ( $25 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ ) and low / moderate doses of nitrogen and potassium ( $79 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$  of both fertilizers).

**Key words:** Leaf area, regression equations, variability, white clover.

## INTRODUCCIÓN

El control de la producción y calidad del forraje en los prados es primordial para el desarrollo de las explotaciones agrarias de montaña. La fertilización permite alcanzar niveles productivos elevados (Rodríguez et al., 2003) y es posible, con diferentes ritmos de explotación, alterar el desarrollo de determinadas plantas entre las que destaca *Trifolium repens* por su calidad nutricional para los animales (García et al., 2004).

En distintos ensayos, con recogida de la hierba exclusivamente mediante siega, se ha puesto de manifiesto que el nitrógeno y el fósforo son factores claves para el desarrollo del trébol blanco (García et al., 2005 y 2006), el cual manifiesta características morfológicas muy variadas según la fertilización recibida.

La presencia de semillas viables en el suelo de esta especie es numerosa y depende, fundamentalmente, del manejo (Reiné et al., 2000) y de la historia del prado (López-Mariño et al., 1998); sin embargo pocas semillas germinan y se establecen, y su vida útil, generalmente, no supera los dos años (Brink et al., 1999). Gustine y Elwinger (2003) estiman que el 80% de las plantas de trébol se deben a crecimiento vegetativo mediante la formación de estolones. A pesar del reducido flujo genético, Gustine y Huff (1999) encontraron alta variación genética dentro y entre poblaciones de trébol blanco y una variabilidad semejante a la de plantas con re-

producción sexual (Widén et al. 1994). Es aceptado, como regla general, que perviven a lo largo del tiempo las plantas mejor adaptadas a los diferentes sistemas de explotación: al pastoreo, riego, diferentes niveles de fertilidad del suelo o incluso a la siega repetida (Klitsch, 1965).

El objetivo de este trabajo es describir las características morfológicas del trébol blanco, tras una experiencia de fertilización de 30 años de duración y siega repetida de forraje y establecer las relaciones entre estas características (fundamentalmente la superficie foliar) y la fertilización recibida.

## MATERIAL Y MÉTODOS

En la Montaña de León y con localización geográfica 42° 55' 52,04'' N y 5° 7' 13,18'' W, se estableció una experiencia de fertilización en una comunidad vegetal que bajo el punto de vista fitosociológico, pertenece al Orden *Arrhenatheretalia elatioris* Tx. 1931; se aplicaron dosis diferentes de nitrógeno y potasio: 0, 60, 120 y 180 kg ha<sup>-1</sup> de N y K<sub>2</sub>O y de fósforo: 0, 80, 160 y 240 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. El ensayo duró 30 años y se utilizó un diseño factorial 4<sup>3</sup> sin repeticiones con todas las combinaciones posibles de los fertilizantes principales (Rodríguez et al., 2003). Durante los primeros diez años el aprovechamiento de la hierba fue mediante dos siegas anuales y durante los veinte años siguientes de tres siegas anuales.

*T. repens* constituye el 9,7% de la producción anual de forraje ( $10\,651\text{ kg ha}^{-1}$  de MS); en el segundo corte es más abundante (15,4% de una producción de  $2\,435\text{ kg ha}^{-1}$  MS) y representa el 69-100% de las leguminosas. Al finalizar la experiencia, en cada una de las 64 parcelas del ensayo se procedió a la separación manual del trébol blanco de una muestra representativa de forraje (1 kg de material verde). El material vegetal utilizado pertenece al segundo corte y de acuerdo con Muñoz *et al.* (2000) el trébol blanco se ajusta a la variedad *repens*.

Los parámetros analizados fueron los siguientes:

Hojas: *foliolo central* (superficie foliar, altura y anchura), *borde foliar* (liso, serrulado o denticulado), *peciolo* (glabro o glabrescente), *peciólulo* (glabro, glabrescente o hirsuto). Flores: *pedúnculo* (glabro o glabrescente), n° de *inflorescencias por muestra*, n° de *flores por inflorescencia*, longitud de la *flor y cáliz*. Semillas: n° de *semillas por fruto*, *superficie* (lisa o rugosa) y *color* (verde, amarillo, anaranjado y rojo).

La *superficie foliar* se obtuvo de 50 hojas por parcela, previo aislamiento de los foliolos centrales, escaneado (resolución de 300 píxeles/pulgada) y aplicación del programa ImageJ (Rasband, 2013); las relaciones entre superficie foliar y la longitud y anchura del foliolo central se realizaron en 10 hojas por parcela. El n° de *inflorescencias por mues-*

*tra* se obtuvo sobre el total del trébol separado y el resto de variables se hizo sobre 5 hojas, flores o frutos por parcela.

Los análisis de los datos incluyen, además de las estadísticas básicas, análisis cluster con las variables morfológicas (method=single) para la definición de los tipos homogéneos de trébol (el punto de corte permite obtener un número reducido de grupos fácilmente identificables), análisis de componentes principales (sin transformaciones) para la representación de los grupos en el espacio definido por ejes ortogonales (combinación de variables morfológicas) y análisis de regresión entre variables productivas y morfológicas. Estos análisis se realizaron con el programa SAS (2013).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis Clúster (Figura 1) muestra la clasificación de las parcelas en cuatro tipos morfológicos de trébol blanco y su correspondencia con diferentes niveles de fertilización NPK. Las características de estos tipos de trébol son:

Tipo A: plantas con la mayor superficie foliar ( $205 \pm 18\text{ mm}^2$ , media  $\pm$  error estándar) y que han presentado mayor número de inflorescencias por muestra. Se encuentran en parcelas con cantidades bajas de nitrógeno ( $20\text{ kg ha}^{-1}\text{año}^{-1}$ ), moderadas de fósforo ( $80\text{ kg ha}^{-1}\text{año}^{-1}$ ) y elevadas de potasio ( $160\text{ kg ha}^{-1}\text{año}^{-1}$ ).

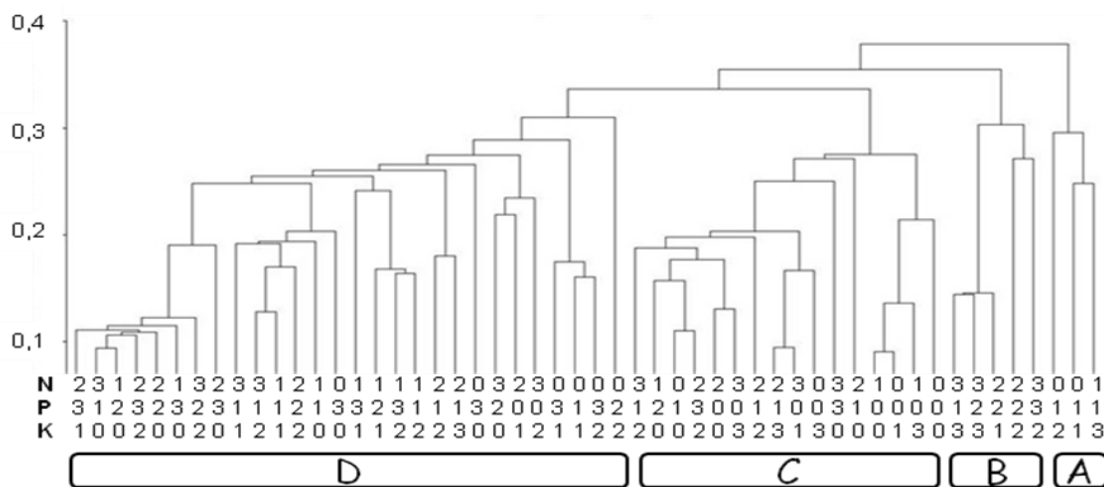


Figura 1. Clasificación de las parcelas con su fertilización NPK y tipos de trébol blanco. (N y K: 0, 1, 2, 3 se corresponden con 0, 60, 120 y 180 kg ha<sup>-1</sup> de N y K<sub>2</sub>O; P: 0, 1, 2, 3 se corresponden con 0, 80, 160 y 240 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>).

Tipo B: plantas con superficie foliar de  $153 \pm 12$  mm<sup>2</sup>, el cáliz es glabrescente en el 72% de los casos y presentan el rango más reducido en cuanto a número de flores/inflorescencia. Predominan en parcelas con elevados contenidos en nitrógeno, fósforo y potasio (156, 160, 156 kg ha<sup>-1</sup>año<sup>-1</sup> respectivamente).

Tipo C: agrupa plantas con la menor superficie foliar ( $117 \pm 6$  mm<sup>2</sup>) y menor número de inflorescencias. Predominan en parcelas en las que el fósforo es escaso (25 kg ha<sup>-1</sup>año<sup>-1</sup>) y el nitrógeno y potasio moderados (79 kg ha<sup>-1</sup>año<sup>-1</sup>).

Tipo D: la superficie foliar es de  $137 \pm 26$  mm<sup>2</sup>. Predominan en parcelas en las que el fósforo es elevado (146 kg ha<sup>-1</sup>año<sup>-1</sup>) y el nitrógeno y potasio moderados (90 y 66 kg ha<sup>-1</sup>año<sup>-1</sup>).

Una serie de características morfológicas (Tabla I) se mantienen contantes para

el conjunto de las muestras analizadas de trébol: borde foliar (denticulado 98%), peciolo (glabrescente en el 93% de los ejemplares), peciólulo (hirsuto 80% y glabrescente 18%), pedúnculo (glabrescente 97%), n° de flores/inflorescencia ( $38,8 \pm 1,3$ ), tamaño de la flor ( $8,0 \pm 0,1$  mm); cáliz ( $2,3 \pm 0,03$  mm), n° de semillas/fruto ( $3,0 \pm 0,1$  y de superficie lisa) y semillas (amarillas 50%, anaranjadas 25 %, rojas 20% y verdes 5%). Otras presentan mayor variación como n° de inflorescencias/muestra, y pilosidad del cáliz.

La superficie foliar (= superficie del foliolo central de la hoja) tiene un amplio rango de variación (mínimo 75,2 mm<sup>2</sup> y máximo 240,4 mm<sup>2</sup>) y un valor medio de  $139,1 \pm 2,2$  mm<sup>2</sup> y está correlacionada significativamente ( $r=0,883$ ) con la longitud y la anchura del foliolo central (12,4-22,4 mm y 11,3-18,1 mm). Las ecuaciones que mejor reflejan estas relaciones son de tipo potencial:



**Tabla 1. Niveles de fertilización y características morfológicas de los diferentes tipos de trébol blanco.**

	Tipo A	Tipo B	Tipo C	Tipo D
Nitrógeno (kg ha <sup>-1</sup> )	20	156	79	90
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (kg ha <sup>-1</sup> )	80	160	25	146
K <sub>2</sub> O (kg ha <sup>-1</sup> )	160	156	79	66
Foliolo central				
<i>Superficie foliar</i> (mm <sup>2</sup> )	205	153	117	137
<i>Altura</i> (mm)	19,9	16,7	14,5	15,6
<i>Anchura</i> (mm)	15,9	15,1	13,2	14,1
Borde foliar*				
<i>Liso</i>	0	0	2	3
<i>Serrulado</i>	0	0	5	0
<i>Denticulado</i>	100	100	93	97
Pecíolo*				
<i>Glabro</i>	7	8	4	11
<i>Glabrescente</i>	93	92	96	89
Peciolulo*				
<i>Glabro</i>	7	0	1	1
<i>Glabrescente</i>	7	24	23	19
<i>Hirsuto</i>	87	76	76	80
Pedúnculo*				
<i>Glabro</i>	0	8	1	4
<i>Glabrescente</i>	100	92	99	96
Nº inflorescencias/muestra	26	19	11	17
<i>Verdes*</i>	23	22	23	26
<i>Intermedias*</i>	41	54	44	46
<i>Secas*</i>	13	24	33	28
Nº flores/inflorescencia				
<i>Rango</i>	25-80	22-58	15-90	11-77
<i>Media</i>	40,3	40,0	34,9	40,1
Flor (mm)				
<i>Rango</i>	6,5-10	6-10	4-10	5-10,5
<i>Media</i>	8,1	8,0	7,9	8,1
Cáliz (mm)				
<i>Rango</i>	2-2,3	2,1-2,5	1,9-2,7	2-2,8
<i>Media</i>	2,1	2,4	2,3	2,3
<i>Glabro*</i>	53	28	40	56
<i>Glabrescente*</i>	47	72	60	44
Nº semillas/fruto				
<i>Rango</i>	1-4	1-6	1-5	0-8
<i>Media</i>	3,3	2,8	2,8	3,0
Semillas (superficie lisa) *				
<i>Verde</i>	0	0	8	13
<i>Amarillo</i>	50	52	48	49
<i>Naranja</i>	25	29	20	19
<i>Rojo</i>	25	19	24	18

(\*) En porcentaje.

$$\text{Superficie foliar} = 1,129 \text{ Altura}^{1,72}$$

$$\text{RSD} = 17,2, R^2 = 0,92$$

$$\text{Superficie foliar} = 0,646 \text{ Anchura}^{2,00}$$

$$\text{RSD} = 18,8, R^2 = 0,91$$

La relación entre la fertilización y las características morfológicas del trébol blanco se pone de manifiesto a través del análisis de componentes principales (Figura 2) y permite la ordenación de las parcelas en el espacio definido por ejes ortogonales resultado de la combinación de variables. El componente I asocia en su parte positiva la fertilización fosfórica y potásica con la superficie foliares mayores y en su parte negativa con superficies foliares menores; el componente II marca una gradación de la fertilización nitrogenada desde la zona positiva hacia la negativa y el componente III diferencia la fertilización fosfórica en la zona positiva y la potásica en la negativa. Los tres componentes recogen el

90,3% de la variación y discriminan cuatro grupos de parcelas con características semejantes de superficie foliar.

En comunidades del Orden *Arrhenatheretalia*, García et al. (2005) han descrito la relación entre la fertilización y la producción de leguminosas y han destacado el efecto positivo del fósforo sobre la abundancia de trébol blanco (García et al., 2006). En este trabajo se muestra el efecto positivo de la fertilización fosfopotásica y la incidencia negativa del nitrógeno sobre la producción de trébol tanto a nivel anual como en el segundo corte:

$$\text{Producción anual} = 1340 - 10,354N + 0,037PK - 0,016NP + 0,032N^2, \text{RSD} = 706, R^2 = 44,0$$

$$\text{Producción de 2º corte} = 506 - 4,240N + 0,013PK - 0,006NP + 0,014N^2, \text{RSD} = 298, R^2 = 38,0$$

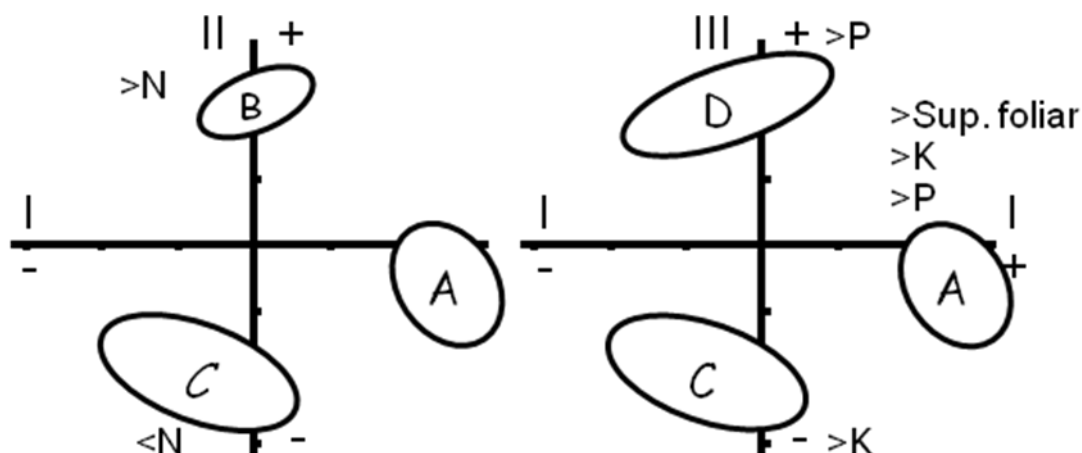


Figura 2. Representación esquemática de la posición de las parcelas asociadas a los tipos A, B, C y D de trébol blanco y de las variables medidas más importantes en los ejes I-II y I-III de un análisis de componentes principales.

Existe, además, una relación entre la producción de trébol y la superficie foliar:

$$\text{Producción de trébol 2º corte} = -898 + 10,8 \text{ Superficie foliar, } RSD= 328, R^2=52,6$$

Y se ha encontrado una relación entre la superficie foliar y la fertilización aportada:

$$\text{Superficie foliar} = 131 + 0,0009PK - 0,0995N + 0,0006K^2, \text{ } RSD= 27,6, R^2=35,6$$

en la que destaca tanto el efecto positivo de la fertilización PK y del potasio como el negativo del nitrógeno.

Estos resultados reflejan la amplia variabilidad de la especie, con especial atención a la superficie foliar, y muestran que la siega y la fertilización mineral repetida permiten el desarrollo de las plantas más productivas y posiblemente mejor adaptadas a estas características de manejo.

## CONCLUSIONES

Hay una relación positiva entre la producción de trébol y la superficie foliar que depende fundamentalmente de la fertilización fosfopotásica y potásica (efecto positivo) y del nitrógeno (efecto negativo). La fertilización NPK continuada y la siega repetida actúan como factores de selección y nos permiten diferenciar cuatro tipos de trébol blanco en base, fundamentalmente, a la superficie foliar.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó con la financiación de la Junta de Castilla y León dentro del programa de ayudas a la actividad investigadora al grupo de excelencia GR158.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRINK G.E., PEDERSON G.A., ALISON M.W., BALL D.M., BOUTON J.H., RAWLS R.C., STEUDEMANN J.A. Y VENU-TO B.C. (1999) Growth of white clover ecotypes, cultivars, and germplasms in the Southeastern USA. *Crop Sci.*, 39, 1809–14.

GARCÍA R., RODRÍGUEZ M., ANDRÉS S. Y CALLEJA A. (2004) Cuarenta años de fertilización en prados de la montaña de León. II. Influencia sobre la composición botánica. *Pastos*, 34 (2), 153-206.

GARCÍA R., ANDRÉS S., ALVARENGA J. Y CALLEJA A. (2005) Efecto de la fertilización NPK y del fraccionamiento del nitrógeno en la producción de tréboles. En: De la Roza B et al., (Eds) *Producciones agroganaderas: gestión eficiente y conservación del medio natural (vol II)*, pp 549-556. Gijón, España: AsturGrag S.L.

GARCÍA R., ANDRÉS S., VALDÉS C. Y CALLEJA A. (2006) *Trifolium repens* L. and *Trifolium pratense* L. under PK fertilization in meadows. En: Lloveras J et al., (Eds) *Sustainable Grassland Productivity: Grassland science in*



Europe, pp 399-401. Badajoz, España: Artes Gráficas Marcipa.

GUSTINE D.L. Y ELWINGER G.F. (2003) Spatiotemporal genetic structure within white clover populations in grazed swards. *Crop Sci.*, 43, 337-344 .

GUSTINE D.L. Y HUFF D.R. (1999) Genetic variation within and among white clover populations from managed permanent pastures of the northeastern USA. *Crop Sci.*, 39, 524-530.

KLITSCH C. (1965) *Producción de forrajes*. Zaragoza, España: Ed. Acribia.

MUÑOZ A., DEVESA J.A. Y TALAVERA S. (2000) *Trifolium* L. En: Talavera S et al., (Eds). *Flora Ibérica* 7 (2), pp 647-720. Madrid, España: Real Jardín Botánico.

LÓPEZ-MARIÑO A., LUIS-CALABUIG E., FILLAT F. Y BERMUDEZ F.F. (1998) La composición florística de la vegetación y del banco de semillas del suelo en prados de los Picos de Europa. *Pastos*, 28 (2), 201-216.

RASBAND W.S. (2013) *ImageJ*. Bethesda, Maryland, USA: U. S. National Institutes of Health, <http://imagej.nih.gov/ij/>

REINÉ R., CHOCARRO C. Y FILLAT F. (2000) Cambios estacionales en el contenido de semillas viables de los suelos de cuatro prados pirenaicos. *Pastos*, 30 (1), 53-69.

RODRÍGUEZ M., GARCÍA R., ANDRÉS S. Y CALLEJA A. (2003) Cuarenta años de fertilización en prados de la montaña de León. I. Influencia sobre la producción. *Pastos*, 33 (1), 103-153.

S.A.S. (2013) *SAS/STAT User's Guide*. Carolina del Norte, USA: Ed. Statistical Analysis System Institute Inc. Cary.

WIDÉN B., CRONBERG N. Y WIDÉN M. (1994) Genotypic diversity, molecular markers and spatial distribution of genets in clonal plants, a literature survey. *Folia. Geobot. Phytotaxon*, 29, 245-263.